

DOI:10.3969/j.issn.1000-7083.2012.05.034

# 大熊猫尿液类固醇激素研究现状及展望

于小杰<sup>1,2</sup>, 胡德夫<sup>2\*</sup>, 吉晟男<sup>2</sup>, 葛兴芳<sup>2</sup>, 唐勇清<sup>2</sup>, 金学林<sup>3</sup>

(1. 河北北方学院动物科技学院, 河北张家口 075000; 2. 北京林业大学, 濒危物种非损伤研究技术实验室, 北京 100083;

3. 陕西省珍稀野生动物抢救饲养研究中心, 西安 710402)

**摘要:**概述了大熊猫尿液样本采集和保存方法, 系统总结了大熊猫尿液类固醇激素的提取方法、测定方法以及大熊猫尿液类固醇激素在应激反应监测、发情期监测及最佳配种时间选择、雌性卵巢功能和妊娠监测、雄性繁殖力评估等方面的应用研究, 结合前人的研究工作, 对大熊猫尿液类固醇激素的应用前景进行展望。

**关键词:**类固醇激素; 尿液; 大熊猫

**中图分类号:** Q955; Q548 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2012)05-0844-04

## Research Progress and Prospects in Urinary Steroid Hormones of Giant Panda

YU Xiao-jie<sup>1,2</sup>, HU De-fu<sup>2\*</sup>, JI Sheng-nan<sup>2</sup>, GE Xing-fang<sup>2</sup>, TANG Yong-qing<sup>2</sup>, JIN Xue-lin<sup>3</sup>

(1. College of Animal Technology, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei Province 075000, China;

2. Lab. of Non-invasive Research Technology for Endangered Species, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

3. Shaanxi Rare Wildlife Rescuing and Breeding Research Center, Xi'an 710402, China)

**Abstract:** This paper summarizes the methods of urinary sample collection and preservation as well as the extraction, determination and researches of urinary steroid hormones in giant panda, including monitoring of stress responses, estrus monitoring, and optimum time for mating, monitoring of ovarian function and gestation in female and assessment of reproductive capacity in male. The promising future of application of urinary steroid hormones in giant panda was argued.

**Key words:** steroid hormones; urine; giant panda

大熊猫是中国特有濒危物种, 生存于亚热带山地竹林, 营独居, 活动隐蔽, 主食竹类。大熊猫的保护一直令人瞩目, 近几十年来业已开展了多角度和多层面的大熊猫保护生物学研究(严旬, 2005; 刘国强, 2008)。鉴于圈养大熊猫存在发情难、交配难、成活难的严峻问题, 其繁殖生理及其相关领域的研究一直是濒危物种繁殖研究领域的焦点。动物的生理状态不仅与其繁殖水平相关, 也是其生存状态的良好指标。

动物体内类固醇激素是一类四环脂肪烃化合物, 是哺乳动物内分泌系统的内源性物质, 能够有效反映机体的生理状态, 而性类固醇激素则是繁殖生理的重要指标。传统上, 研究者主要通过采集动物血液测定类固醇激素水平。尽管血液途径具有简便、快速及准确的优点, 但对于野生动物而言, 获取血液组织存在很大的难度, 且采集血液过程本身是一个强有力的应激源, 可导致动物机体产生较强的应激反应, 直接影响了结果的准确性。目前非损伤采样方法已经在野生动物保护中得到广泛应用。迄今为止, 国内外研究者采用尿液样本测定了大熊猫睾酮、雌二醇、孕酮、皮质醇等类固醇激素, 成功探查了圈养大熊猫的繁殖生理状态。本文系统总结了大熊猫尿液类固醇激素的国内外研究进展, 并对未来研究

进行展望, 以期有助于大熊猫的非损伤研究。

### 1 尿液样本的采集和保存

研究者使用注射器从圈舍地面直接吸取尿液, 采集时间集中于清晨(Bonney *et al.*, 1982; Chaudhuri *et al.*, 1988; Owen *et al.*, 2005; Hama *et al.*, 2008), 有研究者观察动物排尿后立即采集新鲜尿液(Bonney *et al.*, 1982; 曾国庆等, 1990), 有研究者每天早上收集晚上排泄的尿液(Powell *et al.*, 2006; Hama *et al.*, 2008)。对尿液样本的保存不同研究者使用的方法不一。有的将采集的尿液加入万分之一的叠氮钠, 离心后置-20℃冰箱保存待测(李复东等, 1992, 1993; 彭世媛等, 1993), 也有的不加任何防腐剂, 直接置于-20℃(Chaudhuri *et al.*, 1988; 曾国庆等, 1994)或-40℃(Hama *et al.*, 2008)冰箱保存待测。在尿液采集地点到实验室的运送过程中, Chaudhuri 等(1988)使用了干冰。需要注意的是, 叠氮钠对辣根过氧化物酶(HRP)具有抑制作用, 若拟采取酶免疫法测定激素含量就不应在样本保存时加入叠氮钠。

在大熊猫尿液的采集和保存上各位研究者的方法并不完全一致。动物机体类固醇激素存在日变化节律, 仅见李复

收稿日期: 2012-02-09 接受日期: 2012-02-29

基金项目: 科技部林业公益性行业科研专项项目(项目编号: 201004054); 国家林业局大熊猫国际合作资金项目(项目编号: WH0628)

作者简介: 于小杰(1983~), 女, 讲师, 主要从事动物生理学和动物病理学研究, E-mail: jieziyu1222@sina.com

\* 通讯作者 Corresponding author, 教授, 主要从事保护生物学研究, E-mail: hudf@bjfu.edu.cn

东等(1992)逐一采集两昼夜的每次排尿并测定皮质醇含量的日变化节律,其他尿液类固醇激素未见日变化节律的报道。因此我们认为,因研究工作各具条件和时间上的不同,在尿样采集上有必要基于尿液样本的类固醇激素日变化节律;在保存时间上可考虑比较不同保存方法对类固醇激素的影响程度。这样可以有利于同类研究的可比性及生理状态判定的准确性。

## 2 尿液类固醇激素的提取和测定

### 2.1 尿液类固醇激素的提取

研究者提取尿样类固醇激素的方法有所不同。一些研究者去除尿样内的固体杂质后直接测定大熊猫尿样类固醇激素(Monfort *et al.*, 1989;何廷美,郭大智,2002;喻述容等,2003)。田红(2004)直接测定尿液皮质醇和睾酮浓度,测定雌二醇时先将尿液样本自然解冻后,经 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1.5 mL 加入 2 倍体积的二氯甲烷振荡萃取过夜,弃去上清,将有机层用氮气吹干,向干燥试管中加入有醇稀释液 150  $\mu$ L,将样本浓缩 10 倍,溶解过夜,待测。李复东等(1992,1993)和彭世媛等(1993)也采用二氯甲烷提取尿液类固醇激素。施少清等(1988)对于尿液雌二醇采用经  $Al_2O_3$  纯化的无水乙醚提取方法。

显然,不同的尿样处理方法会影响所测定的类固醇激素值,作为同一次研究而言,任何一种尿样处理方法都具有可比性,但不同方法之间则缺乏可比性。因此,比较大熊猫尿液类固醇激素提取方法并遴选最优方法显得十分有必要。

### 2.2 尿液类固醇激素的测定

大熊猫尿液类固醇激素的测定方法主要有放射免疫测定法(radio immunoassay,RIA)(Bonney *et al.*, 1982;Chaudhuri *et al.*, 1988;施少清等,1988;曾国庆等,1990;李复东等,1992,1993;彭世媛等,1993;曾国庆等,1994;Lindburg *et al.*, 2001;田红,2004;Owen *et al.*, 2005;MacDonald *et al.*, 2006)和酶免疫分析法(enzyme immunoassay,EIA)(Powell *et al.*, 2006;Hama *et al.*, 2008)。类固醇激素的放射免疫测定试剂盒和酶免疫测定试剂盒目前已经大量生产并被广泛应用,前人对这两种测定方法介绍的也比较详尽,操作简单。

### 2.3 尿液中肌酐含量的测定及类固醇激素测定值的表示方法

为了避免尿液水分含量差异影响尿液中激素浓度,目前所有研究者均通过测定尿液肌酐值进行修正。将每份尿样中的激素含量除以肌酐(Creatinine,Cr)含量,换算成激素含量与每毫克(mg)肌酐含量的比值,即尿中激素浓度表示为 ng 激素/mg 肌酐(ng/mg Cr)。

测定肌酐的主要方法有苦味酸法(Powell *et al.*, 2006)、酶法(杨秀静等,2009)、液相色谱法(徐静等,2007)、毛细管电泳法(田红,2004)。目前国内研究者大多采用苦味酸法,测定原理为肌酐在强碱中与苦味酸作用产物为橙黄色,通过分光光度计测定吸光值(彭世媛等,1993;MacDonald *et al.*, 2006)。不同研究者使用的分光光度计不同,读取吸光值的波长也有所不同,MacDonald 等(2006)为 490 nm,有的研究者(施少清等,1988;李复东等,1993;彭世媛等,1993)波长采用 520 nm。有研究者将肌酐值  $Cr < 0.05$  mg/mL 的样本排

除不计(MacDonald *et al.*, 2006),也有将肌酐值  $Cr < 0.1$  mg/mL 的样本排除不计的(Owen *et al.*, 2005;Powell *et al.*, 2006)。

采用苦味酸法测定尿液肌酐值,MacDonald 等(2006)将尿液样本用蒸馏水 1:100 稀释,加 100  $\mu$ L 稀释样本于 96 孔微孔滴定板,每个样本设置重复测定;将 1:1 碱性苦味酸盐(100  $\mu$ L 0.04 N 苦味酸:0.75 N 氢氧化钠)试剂加入所有待测样本和标准品中,室温孵育 15 min,490 nm 读取吸光值。Powell 等(2006)将 50  $\mu$ L 尿液(1:20 PBS)加入 96 孔微孔滴定板,加入 0.05 mL 的 0.04 N 苦味酸和 50  $\mu$ L 的 0.75 N 氢氧化钠,每个样本设置重复测定,室温孵育 30 min,490 nm 读取吸光值。

显然,这些研究本身可以表达大熊猫尿液类固醇激素的变化趋势,但不同测定方法之间的可比性仍存在疑问。我们认为,随着这类研究工作的增加,有针对性地选择固定的测定方法和计算方法有助于提高相似研究的可比性。

## 3 尿液类固醇激素在大熊猫生理研究上的应用

### 3.1 应激反应监测

大熊猫尿液类固醇激素的测定结果表明,肾上腺糖皮质激素存在季相变化(Owen *et al.*, 2005)和日变化节律(李复东等,1992;Owen *et al.*, 2005),高强度的噪声能够引起大熊猫应激反应(Owen *et al.*, 2004;Powell *et al.*, 2006),无线电项圈的使用并不会使大熊猫发生明显的应激反应(Durnin *et al.*, 2004)。雄性大熊猫在发情期开始前肾上腺皮质激素水平达到峰值,因此研究者认为肾上腺皮质激素水平在发情前可能扮演了一个预备的角色(MacDonald *et al.*, 2006)。可见,为评估大熊猫管护和科学实验中所遇到的各种刺激,其尿液类固醇激素水平的测定是一种有效的手段。

### 3.2 发情期监测及最佳配种时间选择

雌性大熊猫发情期尿液雌激素(Bonney *et al.*, 1982;Chaudhuri *et al.*, 1988;施少清等,1988;曾国庆等,1990;李复东等,1993;彭世媛等,1993;曾国庆等,1994;Lindburg *et al.*, 2001;喻述容等,2003;Hama *et al.*, 2008)和孕激素(Chaudhuri *et al.*, 1988;施少清等,1988;曾国庆等,1990;李复东等,1993;彭世媛等,1993;曾国庆等,1994;喻述容等,2003)的测定表明,发情高峰期尿液雌激素含量达到峰值且雌激素升高与发情行为密切相关(Chaudhuri *et al.*, 1988;Hama *et al.*, 2008)。Lindburg 等(2006)研究表明雌激素对雌性发情行为具有启动作用。彭世媛等(1993)通过测定雌性大熊猫发情期尿液雌二醇与孕酮含量及妊娠期尿中孕酮含量的变化得出,雌二醇从发情期开始上升并在发情高潮时达峰值,孕酮含量则在发情高潮期下降,在发情后期上升,妊娠期尿中孕酮含量的变化特点是在妊娠早期与晚期升高并在晚期出现峰值,妊娠中期恢复至较低水平并在分娩前迅速下降。

Bonney 等(1982)研究表明,可以通过监测雌性个体雌激素分泌水平确定自然交配或者人工授精的精确时间,李复东等(1993)也得出大熊猫自然交配或人工授精的适宜时间可根据雌性大熊猫尿液中雌二醇含量予以确定。曾国庆等(1990)得出,在发情高峰期雌性大熊猫出现雌二醇和促黄体生成素高峰,黄体生成素的峰值出现在雌二醇峰值之后,表

明尿液中雌二醇和黄体生成素含量的变化可为选择人工授精的最佳时间提供可靠的理论依据。彭世媛等(1993)研究表明在发情高潮期雌二醇出现峰值的当日和次日配种,成功受孕并产仔;喻述容等(2003)对 39 只雌性大熊猫发情期尿液雌酮含量进行测定,得出当尿液雌酮/肌酐峰值 > 60 ng/mg 时,达到峰值后的 12 h 内进行配种其受孕率达 100%,在峰值后的 12~24 h 内配种其受孕率为 83.3%,而在峰值后的 24 h 后配种受孕率为 0,由此表明当雌性大熊猫尿液雌酮含量达到峰值时是最佳配种时间。显然,这些研究为准确把握圈养大熊猫的发情及最佳配种时间,促进人工繁育奠定了扎实的繁殖生理依据。

### 3.3 卵巢功能和妊娠监测

对雌性大熊猫妊娠期雌激素(Chaudhuri *et al.*, 1988;彭世媛等,1993;曾国庆等,1994)和孕激素(Chaudhuri *et al.*, 1988;彭世媛等,1993;曾国庆等,1994;何廷美,郭大智,2002)研究发现该物种具有延迟着床的特征(Chaudhuri *et al.*, 1988;Monfort *et al.*, 1989)。施少清等(1988)研究得出,雌性大熊猫在发情高潮后两天,尿中黄体生成素的生物活性与雌二醇同时出现峰值,并与雄性交配,随后尿中孕酮浓度迅速增长,其浓度远远大于发情前期的水平,表明雌性大熊猫在发情期中有成熟的卵子排出。何廷美和郭大智(2002)通过测定认为,在大熊猫妊娠后期的 1~2 个月内对其尿液孕酮含量进行检测有助于判断该大熊猫是否能够顺利产仔。圈养大熊猫存在诸多繁殖困难,因此该物种生殖生理研究显得尤其重要。我们认为,通过尿样研究大熊猫生殖腺生理活动过程,对遴选参配雌性个体并成功繁育健康后代是至关重要的;圈养条件下的营养、环境等因子对大熊猫繁殖生理的影响应成为下一步研究的着眼点。

### 3.4 雄性繁殖力评估

吴登虎和郭伟(2004)比较了两只圈养雄性大熊猫的尿样睾酮水平,发现老龄与壮年大熊猫在同一时期内尿样睾酮激素含量基本处于相同水平,无显著差异,认为其老龄雄性大熊猫仍具有繁殖能力。遴选雄性大熊猫参与繁殖是成功的重要保障,但受研究个体数的限制,我们还不清楚年龄与繁殖能力之间的关系,尤其是老龄雄性大熊猫睾酮水平的持续时间仍无确定的结果,有待进一步的测定。

## 4 大熊猫尿液类固醇激素应用展望

大熊猫尿液类固醇激素水平能够有效地反映其繁殖生理状态和应激生理状态,加之其提取方法和测定方法日臻完善,在今后的大熊猫保护研究工作中将具有良好的应用前景。

尿液检测作为非损伤采样检测方法,首先,尚需要仔细研究大熊猫尿液与血液、尿液与粪便类固醇激素水平的对应关系,这样才能为不同来源样本之间研究结果的比对奠定依据;其次,探索尿液类固醇激素不同的保存方法和提取方法之间的差异,进一步确立简便并可资比较的尿样处理方法,对不同研究者之间的研究结果具有可比性至关重要;再者,目前的研究主要集中于大熊猫繁殖期的生理状态研究,除了应激反应外,很少涉及不同因子对大熊猫生理影响的非损伤

研究,更未见不同个体的生理特性研究,这是今后有待开展的工作。

相对于大熊猫粪便类固醇激素的保存和提取,该物种的尿液类固醇激素测定较难运用到野生大熊猫。野外大熊猫科学调查给我们以启迪,该物种生活于亚热带亚高山区,冬季相对寒冷,多有积雪存积,而雪尿是较为容易获取和保存的尿液样本,这可能是野外大熊猫研究和监测的一条途径。然而,如何有效寻觅到野外大熊猫的尿迹并获取样本,是开展冬季大熊猫生理和生存状态的潜在途径,尚待今后开展实地验证工作。

## 5 参考文献

- 何廷美,郭大智. 2002. 雌性大熊猫配种后尿液孕酮含量的变动[J]. 四川农业大学学报, 20(2): 138~140.
- 李复东,彭世媛,裴轶劲,等. 1992. 大熊猫尿中皮质醇含量变化的日周期[J]. 四川大学学报(自然科学版), 29(3): 426~430.
- 李复东,彭世媛,叶志勇,等. 1993. 雌性大熊猫发情期尿中 17 $\beta$ -雌二醇与孕酮水平的变化及其与配种的关系[J]. 兽类学报, 13(3): 166~171.
- 刘国强. 2008. 野外大熊猫种群数量调查[J]. 中国林业, 22: 52~54.
- 彭世媛,李复东,叶志勇,等. 1993. 雌性大熊猫发情期与妊娠期尿液性激素的变化[J]. 动物学杂志, 28(2): 25~28.
- 施少清,董琳,陈玉村. 1988. 大熊猫雌性个体发情期生殖内分泌变化的研究[J]. 兽类学报, 8(1): 1~6.
- 田红. 2004. 圈养大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)的化学通讯与亲缘辨别[D]. 北京:北京师范大学.
- 吴登虎,郭伟. 2004. 圈养雄性大熊猫尿中睾酮激素水平的测定[J]. 四川动物, 23(2): 132~133.
- 徐静,王涛涛,徐国宾. 2007. 几种人血清肌酐常规测定方法与反相高压液相色谱测定法的比对研究[J]. 中华检验医学杂志, 30(6): 683~686.
- 严旬. 2005. 野生大熊猫现状、面临的挑战及展望[J]. 兽类学报, 25(4): 402~406.
- 杨秀静,程金华,刘沫然. 2009. 二种酶法测定肌酐的结果比较[J]. 检验医学, 24(11): 852.
- 喻述容,张志和,余建秋,等. 2003. 繁殖期雌性大熊猫尿中激素变化的研究[J]. 畜牧兽医学报, 34(5): 452~456.
- 曾国庆,蒋广秦,刘维新,等. 1994. 大熊猫全年尿中孕酮和 17 $\beta$ -雌二醇水平的变化[J]. 动物学报, 40(3): 333~336.
- 曾国庆,蒋广秦,杨克勤,等. 1990. 大熊猫生殖生物学研究: I. 大熊猫发情期血清和尿液中促黄体素、孕酮和 17 $\beta$ -雌二醇含量的变化[J]. 动物学报, 36(1): 63~69.
- Bonney RC, Wood DJ, Kleimant DG. 1982. Endocrine correlates of behavioural oestrus in the female giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) and associated hormonal changes in the male[J]. *Reproduction*, 64(1): 209~215.
- Chaudhuri M, Kleiman D, Wildt D, *et al.* 1988. Urinary steroid concentrations during natural and gonadotrophin-induced oestrus and pregnancy in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) [J]. *Reproduction*, 84(1): 23~28.
- Durnin ME, Swaisgood RR, Czekala N, *et al.* 2004. Effects of radiocollars on giant panda stress-related behavior and hormones[J]. *Journal of*

- Wildlife Management, 68(4): 987~992.
- Kersey DC, Wildt DE, Brown JL, *et al.* 2010. Endocrine milieu of perioestrus in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*), as determined by non-invasive hormone measures[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 22: 901~912.
- Lindburg DG, Czekala NM, Swaisgood RR. 2001. Hormonal and behavioral relationships during estrus in the giant panda[J]. *Zoo Biology*, 20: 537~543.
- MacDonald E, Czekala N, Wang PY. 2006. Urinary testosterone and cortisol metabolites in male giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) in relation to breeding, housing, and season[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 52(2): 242~249.
- Monfort SL, Dahl KD, Czekala NM, *et al.* 1989. Monitoring ovarian function and pregnancy in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) by evaluating urinary bioactive FSH and steroid metabolites[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 85: 203~212.
- Owen MA, Czekala NM, Swaisgood RR, *et al.* 2005. Seasonal and diurnal dynamics of glucocorticoids and behavior in giant pandas[J]. *Ursus*, 16(2): 208~221.
- Owen MA, Swaisgood RR, Czekala NM, *et al.* 2004. Monitoring Stress in Captive Giant Pandas (*Ailuropoda melanoleuca*): Behavioral and Hormonal Responses to Ambient Noise[J]. *Zoo Biology*, 23: 147~164.
- Powell DM, Carlstead K, Tarou LR, *et al.* 2006. Effects of construction noise on behavior and cortisol levels in a pair of captive giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. *Zoo Biology*, 25(5): 391~408.
- Xiao Xu, Yuzhi Li, Xiaofang Wang, *et al.* 2009. Zinc-finger intron 7: a new locus for sex identification of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. *Zoo Biology*, 28: 1~6.
- (上接第 840 页)
- 李援越. 2002. 多元分析法在生态学中的应用[J]. *贵州大学学报(农业与生物科学版)*, (3): 215~218.
- 马国强, 李秋洁, 张堂松, 等. 2010. 高速公路对路域生态系统的的影响及修复技术研究进展[J]. *林业调查规划*, 35(3): 29~34.
- 马克平, 刘玉明. 1995. 生物群落多样性的测度方法 II  $\beta$  多样性的测度方法[J]. *生物多样性*, 3(1): 38~43.
- 秦志斌, 刘朝晖, 李宇峙, 等. 2005. 路域生态系统建设原则[J]. *公路交通科技*, 22(8): 152~154.
- 钱燕文. 1995. 中国鸟类图鉴[M]. 郑州: 河南科技出版社.
- 吴勇, 刘新荣, 梁乃兴, 等. 2009. 山区公路路域生态系统保护模式[J]. *公路交通技术*, (2): 154~158.
- 许龙, 张正旺, 丁长青. 2003. 样线法在鸟类数量调查中的运用[J]. *生态学杂志*, 22(5): 127~130.
- 许维枢, 王玢莹, 程学义. 1996. 中国野鸟图鉴[M]. 台北: 翠鸟文化事业公司.
- 杨杰, 张秀雷, 陆钢, 等. 2007. 四川老君山自然保护区不同生境鸟类多样性研究[J]. *四川动物*, 26(4): 760~763.
- 于洋, 王永吉, 王文. 2010. 吉林卢家林场春季不同生境鸟类多样性研究[J]. *野生动物*, 31(2): 86~89.
- 约翰·马敬能, 卡伦·菲利普斯, 何芬奇. 2000. 中国鸟类野外手册[M]. 长沙: 湖南教育出版社.
- Elzanowski A, Ciesiokiewicz J, Kaczor M, *et al.* 2009. Amphibian road mortality in Europe: a meta-analysis with new data from Poland[J]. *European Journal of Wildlife Research*, 55(1): 33~43.
- Forman RTT. 2000. Estimate of the area affected ecologically by the road system in the United States[J]. *Conservation Biology*, 14(1): 31~35.
- Forman RTT, Deblinger RD. 2000. The Ecological Road-Effect Zone of a Massachusetts (USA) Suburban Highway[J]. *Conservation biology*, 14(1): 36~46.
- Glista DJ, DeVault TL, DeWoody JA. 2009. A review of mitigation measures for reducing wildlife mortality on roadways[J]. *Landscape and Urban Planning*, 91(1): 1~7.
- Kuehn R, Hindenlang KE, Holzgang O, *et al.* 2007. Genetic effect of transportation infrastructure on roe deer populations (*Capreolus capreolus*)[J]. *Journal of Heredity*, 98(1): 13.
- McLellan BN, Shackleton DM. 1988. Grizzly bears and resource-extraction industries: effects of roads on behaviour, habitat use and demography[J]. *Journal of Applied Ecology*, 32: 451~460.
- Pielou EC. 1975. *Ecological diversity*[M]. Wiley New York.
- Reijnen R, Foppen R, Braak CT, *et al.* 1995. The effects of car traffic on breeding bird populations in woodland. III. Reduction of density in relation to the proximity of main roads[J]. *Journal of Applied Ecology*, 32: 187~202.
- Shannon CE, Weaver W. 1949. *The mathematical theory of communication* (Urbana, IL)[M]. University of Illinois Press.
- Taylor BD, Goldingay RL. 2004. Wildlife road-kills on three major roads in north-eastern New South Wales[J]. *Wildlife Research*, 31(1): 83~91.
- Vos C. 1998. Effects of habitat fragmentation and road density on the distribution pattern of the moor frog *Rana arvalis*[J]. *Journal of Applied Ecology*, 35(1): 44~56.